ISSN 1561-6274. Нефрология. 1999. Том 3. № 2.

© Коллектив авторов, 1999
УДК 615.25.015.3:616.61-008.61-036.12-092.9

А.М. Есаян, В.В. Барабанова, В.А. Титова, И.Г. Каюков, И.К. Клемина, О.Н. Береснева, Н.А. Пенчул, С.Г. Чефу

ВЛИЯНИЕ ФУРОСЕМИДА НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

A.M.Essaian, V.V.Barabanova, V.A.Titova, I.G.Kaykov, I.K.Klemina, O.N.Beresneva, N.A.Penchul, S.G.Chefu

THE INFLUENCE OF FUROSEMIDE DURING THE DEVELOPMENT OF CHRONIC RENAL FAILURE IN EXPERIMENT

Научно-исследовательский институт нефрологии, курс нефрологии и диализа Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им.акад. И.П.Павлова, Россия

РЕФЕРАТ

Исследовали влияние фуросемида на развитие хронической почечной недостаточности у крыс с субтотальной резекцией почки.Фуросемид применяли спустя 7 нед после операции в дозах 20, 60, и 120 мг на 1кг массы тела.Спустя 8 нед крысы были забиты.

Малые дозы фуросемида (20 и 60 мг) оказались эффективными в отношения развития азотемии в отличие от дозы 120 мг. Фуросемид во всех дозах оказал превентивное влияние в отношении начальных склеротических изменений клубочка, однако в дозе 120 мг вызвал усиление дистрофических изменений в дистальных канальцах.

Обсуждается неоднозначный эффект применения фуросемида в связи с неспецифичностью его действия на ионные транспортные механизмы.

Ключевые слова: экспериментальная хроническая почечная недостаточность, фуросемид.

ABSTRACT

Under investigation was the effect of furosemide on the development of chronic renal failure in rats subjected to renal mass ablation. The rats received 20,60,120 mg per kg furosemide daily through 7 week after operation. After the 8th week the rats were decapitated.

Furosemide 20 and 60 mg/kg prevented the development of uremia, but furosemide in dosage 120 mg did not have this effect. Furosemide in any dosage caused preventive action on initial sclerotic glomerular changes, but in dosage 120mg furosemide increased the dystrophic process in distal tubules.

The effect of furosemide is discussed in connection with its influence on the ionic transport mechanisms.

Key words: experimental chronic renal insufficiency, furosemid.

ВВЕДЕНИЕ

Петлевой диуретик фуросемид достаточно широко применяется в нефрологической практике для коррекции водно-электролитных нарушений, а также для потенцирования эффекта ингибиторов АПФ, особенно при скорости клубочковой фильтрации менее 30 мл/мин. С другой стороны, фуросемид, подавляя активность канальцево-клубочкового механизма обратной связи, может вызвать гиперфильтрацию в функционирующих нефронах, что является неблагоприятным гемодинамическим фактором прогрессирования почечного заболевания [7, 13].

Целью работы было изучение влияния различных доз фуросемида на течение экспериментальной почечной недостаточности и степень структурных повреждений почек у крыс линии Вистар.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Использовали крыс-самцов линии Вистар массой 180—220 г. Модель почечной недостаточности создавали посредством поэтапной субтотальной нефрэктомии, описанной ранее [2]. Животные содержались на стандартной диете (8 г белка в сутки) при свободном доступе к воде.

Через 8 дней после второго этапа операции крысы были разделены на 4 группы. Крысы 1-, 2-, 3-й группы получали фуросемид per os в дозе 20, 60 и 120 мг на 1 кг массы тела, соответственно, контрольная группа (К) препарат не получала. Количество животных в контрольной группе — 18, в 1-й — 9, во 2-й — 8, в 3-й — 7. В конце 1-, 2-, 5-й и 7-й недели животных помещали в метаболическую камеру для определения объема мочи и содержания в ней креатинина, мочевины, электролитов рутинными методами.

Накануне проведения первого этапа операции и перед забоем те же показатели определяли в сыворотке крови, взятой из хвостовой вены.

Забой производили через 7 нед после второго этапа операции под эфирным наркозом. Измеряли массу оставшейся почки, легких, печени, селезенки, миокарда.

Оставшуюся ткань почки фиксировали в 10% нейтральном формалине с последующей парафиновой заливкой. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином, хромотропом и окраской PAS. Изменения структуры оставшейся почки оценивали два независимых исследователя полуколичественным методом, выражая результаты оценки в баллах (0, 1, 2, 3). Анализировали 20 морфологических показателей, отражающих начальные изменения в клубочках, а также состояние канальцев и интерстиция. Оценивали степень ранних изменений в клубочках: пролиферацию клеток мезангия, увеличение мезангиального матрикса, утолщение базальной мембраны, сегментарный склероз, наличие в капиллярах фибрина, эритроцитарных тромбов, сращений капилляров клубочков с капсулой. В проксимальных канальцах оценивали изменения щеточной каймы, степень выраженности зернистой и гиалиново-капельной дистрофии, субатрофии и атрофии. В дистальных канальцах — дистрофию и субатрофию, наличие белковых цилиндров с фибрином и эритроцитарных тромбов. В интерстиции — фиброз, а также степень развития послеоперационного рубца и инфильтрации рубца. В сосудах — состояние сосудистой стенки.

Для статистической обработки использовали взвешенный критерий Смирнова, критерии Уилкоксона, Стьюдента, Уэлча при уровне значимости $p<0,05$ (табл. 1—3).

Таблица 1

Изменение массы органов у животных с ХПН и у животных с ХПН, получавших фуросемид ($\bar{X}$±m)

Показатели	Группа крыс			
	К	1-я	2-я	3-я
Прирост массы крысы, г	+40	+56	+20,4	+26,6
Процент удаления массы почек	78,79±3,82	78,22±6,78	73,65±2,93	78,49±3,89
Процент регенерации почек	5,17	12,98*	33,74*	10,74*
Индекс гипертрофии миокарда	0,53±0,10	0,34±0,04*	0,42±0,09	0,34±0,02*
Масса легких, г	2,44±0,60	2,25±0,34	2,19±0,67	2,17±0,4
Масса печени, г	9,65±2,50	10,6±1,6	6,18±1,29	10,7±1,4
Масса селезенки, г	1,14±0,3	1,42±0,27	0,73±0,08	1,23±0,27

* Разница достоверна относительно контроля, $p<0,01$

Таблица 2

Биохимические показатели крови крыс с ХПН и крыс с ХПН, получавших фуросемид ($\bar{X}$±m)

Показатели	Группа крыс			
	К	1-я	2-я	3-я
Cr, ммоль/л	0,12+0,01	0,10+0,02	0,11+0,03	0,12+0,33
Ur, ммоль/л	13,9±1,5(**)	8,9±1,8*(**)	8,9±0,7*(**)	12,9±2,5(**)
K^+, ммоль/л	7,5±0,4	7,83±0,48	7,23±0,53	7,37±0,28
Na^+, ммоль/л	143,0±3,2	145,2±4,4	140,9±4,4	138,8±2,5
Ca^{2+}, ммоль/л	—	0,62±0,18	—	0,66±0,06
Ca общ., ммоль/л	2,8±0,1	2,67±0,22	2,33±0,07	2,68±0,18
P, ммоль/л	3,0±0,5	2,54±0,35	2,75±1,04	2,44±0,81

* Различия достоверны относительно контроля, $p<0,05$.

** Различия достоверны между группами.

Таблица 3

Биохимические показатели мочи крыс с ХПН и крыс с ХПН, получавших фуросемид ($\bar{X}$±m)

Показатели	Группа крыс			
	К	1-я	2-я	3-я
Диурез, мл	9,88±3,63	11,3±3,4	20,0±6,0 *	14,6±6,8
Cr, ммоль/л	9,98±3,45	7,1±0,8	3,45±0,91 *	5,7±1,5
Ur, ммоль/л	539,1±222,9	505,0±145,4	116,3±107,6*	4,46±145,1
K+, ммоль/л	73,70±30,44	—	28,50±7,32*	—
Na+, ммоль/л	70,11±18,32	—	155,66±38,70 *	—
Ca, ммоль/л	1,54±0,53	0,61±0,10*(**)	1,7±0,8(**)	1,04±0,46
P, ммоль/л	56,3±27,7	62,8±13,0	35,82±25,27	47,8±14,8
Cl, ммоль/л	110,60±59,25	—	167,16±41,45	—
Суточная потеря белка	3,36±3,26	2,6±2,3	2,09±1,76	3,5±2,9

* Различия достоверны относительно контроля, $p<0,05$.

** Различия достоверны между группами.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе изменений клубочков выявлено, что увеличение мезангиального матрикса было достоверно

меньше выражено в группах крыс, получавших фуросемид в дозах 20 и 120 мг/кг, в то время как по этому показателю не было достоверных различий между К и 2-й группами ($p<0,05$). Степень утолщения базальной мембраны была достоверно выше в К группе в сравнении со всеми группами, получавшими фуросемид ($p<0,05$). Отложение фибрина в капиллярах клубочка было достоверно больше выражено в К группе, чем в 1-й и 2-й группах, получавших 20 и 60 мг препарата ($p<0,05$). Группа 3 не имела достоверных различий с контрольной группой по этому параметру. По наличию эритроцитарных тромбов достоверно отличалась от контроля только 3-я группа, получавшая максимальную дозу фуросемида ($p<0,05$).

Различия в выраженности сращений капилляров клубочка с капсулой получены только во 2-й группе. Зернистая дистрофия была меньше выражена в сравнении с контролем в 3-й группе, в то время как гиалиново-капельная дистрофия была меньше выражена в 1-й и 2-й группах и больше в 3-й группе ($p<0,05$).

Достоверные различия по степени повреждения щеточной каймы наблюдались только между К и 1-й группой, при этом в К группе повреждение щеточной каймы было выражено существенно больше ($p<0,01$). Степень развития послеоперационного рубца была в К группе выше, чем в 1-й, в то время как степень его инфильтрациии была ниже в К группе в сравнении с 1-й и 3-й ($p<0,05$). Белковые цилиндры с фибрином чаще встречались в К группе в сравнении с 1-й. Субатрофия дистальных канальцев была достоверно ниже в К группе в сравнении с группами 1 и 3 ($p<0,01$).

Помимо сравнения с контролем, был проведен межгрупповой анализ выраженности структурных изменений у крыс, получавших фуросемид. При этом было выявлено, что степень выраженности отложения фибрина в капиллярах, наличие эритроцитарных тромбов и сращений с капсулой капилляров возрастает в прямой зависимости от дозы фуросемида: от группы 1 к группе 3. Парное сравнение показало, что наличие эритроцитарных тромбов было больше выражено в 3-й группе в сравнении с 1-й, а повреждение щеточной каймы во 2-й группе выше, чем в 1-й. Субатрофия дистальных канальцев достоверно выше во 2-й группе в сравнении с 3-й ($p<0,05$).

Проведено также исследование изменения массы органов в изучаемых группах (см. табл.1). Крысы, получавшие 20 мг фуросемида (1-я группа), имели прибавку массы, превышающую на 40 % прибавку массы тела контрольных крыс, в то время, как крысы 2-й и 3-й группы имели прибавку массы тела, соответственно, на 50 и 45% меньше К группы. Регенерация массы почек животных, получавших фуросемид, была выше, чем регенерация в К группе, превышая в 1-й группе в 2,5 раза, во 2-й — в 6,7 раза и в 3-й — в 2 раза уровень регенерации массы почек К группы. Индекс гипертрофии миокарда был достоверно ниже в 1-й и 3-й группе в сравнении с контролем. Масса других органов (легких, печени, селезенки) не имела различий в группах.

В группах 1 и 2 имелось достоверное снижение уровня мочевины сыворотки крови в сравнении с контрольной группой, те же группы достоверно отличались по этому показателю от 3-й группы (см. табл. 2).

В моче (см. табл.3) достоверное увеличение диуреза относительно контроля выявлено только в 3-й группе. В той же группе отмечалось снижение экскреции мочевины, K^+ и увеличение выведения Na^+ по сравнению с К. Содержание Ca^{++} в моче было снижено в моче группы 1 в сравнении с контролем и группой 3. Достоверных различий в суточной потере белка выявлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Применяя фуросемид в экспериментальном исследовании, мы рассчитывали не только на прямой диуретический эффект, но и на другие эффекты его влияния, главным образом — на сердечно-сосудистую систему. Известно, что фуросемид осуществляет блокаду $Na^+/K^+/2Cl^-$ котранспортера не только в толстом восходящем колене петли Генле [6], но и других тканях и органах, как то, кардиомиоциты [1, 3] и гладкомышечные клетки сосудов [8]. Основное действие на сердечно-сосудистую систему связано с его вазодилатирующим эффектом, одним из ведущих механизмов которого является увеличение синтеза и секреции кининов эндотелиального происхождения [5, 12]. Кроме того, фуросемид усиливает брадикининовый механизм образования NO, которое имеет полифункциональное действие, в том числе снижает агрегацию тромбоцитов [11], а также ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов [12]. Посредством улучшения коронарного кровотока и уменьшения гемодинамической нагрузки фуросемид способен предотвращать гипертрофию миокарда [3].

К отрицательным эффектам фуросемида, с точки зрения ренальной гемодинамики, относится избыточное образование NO и, связанное с этим, снижение тонуса афферентной артериолы, что в свою очередь способствует развитию внутриклубочковой гипертензии/гиперфильтрации [4]. С другой стороны, стимуляция образования ангиотензина II приводит к повыше-

нию тонуса эфферентной артериолы, подавлению активности механизма канальцево-клубочковой обратной связи, увеличению объема клубочков за счет пролиферации мезангиальных клеток [9]; повышению уровня паратиреоидного гормона [10] .

В настоящем исследовании мы получили достоверные данные о превентивном эффекте фуросемида на гипертрофию миокарда. Индекс гипертрофии миокарда у крыс, получавших фуросемид, был близок к таковому у здоровых интактных животных [3].

Нами было получено достоверное увеличение массы регенерирующей культи почки на фоне приема препарата. Отдавая себе отчет в сложности и многогранности процессов регенерации, мы полагаем, что возможно и здесь положительное влияние оказало улучшение гемодинамики.

Фуросемид в дозе 20 и 60 мг/кг оказал положительный эффект на показатели уремии: отмечены достоверно более низкие уровни мочевины в группах 1 и 2 относительно контроля и относительно группы 3.

Можно полагать, что связанное с NO снижение агрегационной способности тромбоцитов — также один из благоприятно действующих эффектов в отношении развития ранних склеротических процессов в клубочке. По-видимому, с тем же фактором связан благоприятный эффект малых и средних доз фуросемида на такой морфологический показатель внутриклубочковых гемодинамических процессов, как фибрин в капиллярах. Большая доза (120 мг) не оказывала положительного действия на этот показатель. В этой же группе достоверно выявлен еще один неблагоприятный признак нарушения гемодинамики — в виде увеличения числа эритроцитарных тромбов.

Во всех группах фуросемид дал превентивный эффект на развитие утолщения базальных мембран, а также на степень увеличения мезангиального матрикса. В группе 2 выявлен положительный эффект на начальные склеротические процессы (меньшая выраженность сращения капиллярных петель с капсулой).

Фуросемид в различных дозах не оказывал существенного влияния на величину протеинурии. Тем не менее, морфологические исследования показали, что на фоне приема малых и средних доз фуросемида достоверно меньше была выражена степень гиалиново-капельной дистрофии проксимальных канальцев, которая отражает в принципе истощение процессов реабсорбции белка. В то же время прием фуросемида в большой дозе способствовал нарастанию гиалиново-капельной дистрофии. Применение малых доз фуросемида оказало положительное действие на сохранность щеточной каймы. В группе 1 и 3 достоверно больше выражена субатрофия дистальных канальцев.

Применение малых доз фуросемида оказало положительное действие на развитие послеоперационного рубца, напротив, применение дозы в 120 мг ускорило развитие начальных склеротических изменений в клубочке — сращений с капсулой. При сравнении групп между собой выявлена зависимость между дозой и степенью развития сращений с капсулой, равно как и со степенью развития гемодинамических нарушений (фибрин в капиллярах и эритроцитарные тромбы).

Необходимо заметить, что использование фуросемида вызвало усиление атрофических процессов в эпителии дистальных канальцев. Как известно, именно дистальные канальцы (в частности, участок macula densa) являются структурной основой канальцево-клубочкового механизма обратной связи и атрофические процессы в эпителии канальцев, безусловно, влияют на функцию эпителиальных клеток и, таким образом, на механизм ауторегуляции клубочковой фильтрации отдельного нефрона. Можно полагать, что отсутствие положительного эффекта от применения высоких доз связано с проявлением одного из отрицательных свойств фуросемида — подавлением активности канальцево-клубочкового механизма обратной связи с последующим развитием внутриклубочковой гипертензии/гиперфильтрации [4, 13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог всему сказанному, можно оценить эффект использования фуросемида как неоднозначный. Применение малых доз фуросемида (в отличие от высокой дозы — 120 мг) оказало в целом положительное влияние как на структурные изменения, отражающие гемодинамические процессы в клубочке, так и на развитие азотемии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Багров Я.Ю. Взаимодействие негормональных лекарств с гормонами в лечении заболеваний почек (от побочного эффекта к направленному действию) // Нефрология.—1997.—Т. 1, № 1.—С. 18—26.

2. Барабанова В.В., Береснева О.Н., Мирошниченко Е.Л. и др. Функциональная активность воротной вены как отражение метаболических изменений при экспериментальной хронической почечной недостаточности // Физиол. журн.—1993.— Т. 79, № 1.—С. 64—72.

3. Барабанова Т.А., Пенчул Н.А. Экспериментальная хроническая почечная недостаточность, фуросемид и сократимость миокарда. Сообщение I // Нефрология.—1998.—Т. 3, № 3.—С. 104—109.

4. Christian T., Persson A., Eric G. Inhibition of locally produced nitric oxide resets tubuloglomerular feedback mechanism // Amer. J. Physiol.—1994.—Vol. 267, № 4.—P. 606—611.

5. Gabriele W., Fink E., Liuz W. Furosemide enhances the release of endothelial kinis, nitric oxide and prostacyclin // J. Pharmacol. Exp. Ther.—1994.—Vol. 271, № 3.—P. 1611—1615.

6. Greger R. Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop mammalian nephron // Physiol. Rev.—1985.—Vol. 65.—P. 760—797.

7. Hostetter T.H., Olson J.L., Rennke H.G. et al. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation // Amer. J. Physiol.— 1981.—Vol. 241.—P. F85.

8. Johnstone G.D., Hiatt W.R., Nies A.S. et al. Factors modifying the early nondiuretic vascular effects of the furosemide in man // Circ. Res.—1983.—Vol. 53.—P. 630—635.

9. Lane P.H. Furosemide treatment, angiotensin II and renal growth and development in the rat // Pediat. Res.—1995.—Vol. 37, № 6.—P. 747—754.

10. Reichel H., Deibert B., Geberth S. et al. Furosemide therapy and intact parathyroid hormone plasma concentration in chronic renal insufficiency // Nephrol. Dial. Transplant.—1992.—Vol. 7, № 1.—P. 8—15.

11. Remuzzi G., Perico N., Zoja G. et al. Role of endotelium-derived nitric oxide in the bleeding tendency of uremia // J. Clin. Invest.—1990.—Vol. 86.—P. 1768—1771.

12. Thiemermann G. Biosynthesis and interaction of endotelium-derived vasoactive mediators // Eicosanoids.—1991.—Vol. 4.—P. 187—202.

13. Thomson S.C., Blantz R.C. Tubuloglomerular feedback // Amer. J. Nephrol.—1988.—Vol. 8, № 4.—P. 393—401.

Поступила в редакцию 04.04.99 г.